

PCT/JP 03/08132

26.06.03

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2002年 6月28日

出 願 番 号
Application Number: 特願2002-189137
[ST. 10/C]: [JP 2002-189137]

出 願 人
Applicant(s): 株式会社ゲン・コーポレーション

REC'D 15 AUG 2003

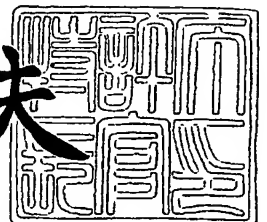
WIPO PCT

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 7月31日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 P02-0349

【提出日】 平成14年 6月28日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A61K 39/395

【発明の名称】 抗鶏コクシジウム症組成物

【請求項の数】 6

【発明者】

【住所又は居所】 岐阜県岐阜市佐野 8 3 9 番地の 1 株式会社 ゲン・コーポレーション 免疫研究所内

【氏名】 兒玉 義勝

【発明者】

【住所又は居所】 岐阜県岐阜市佐野 8 3 9 番地の 1 株式会社 ゲン・コーポレーション 免疫研究所内

【氏名】 横山 英明

【発明者】

【住所又は居所】 岐阜県岐阜市佐野 8 3 9 番地の 1 株式会社 ゲン・コーポレーション 免疫研究所内

【氏名】 ヌグエン サーバン

【特許出願人】

【識別番号】 000129976

【氏名又は名称】 株式会社 ゲン・コーポレーション

【代理人】

【識別番号】 100091096

【弁理士】

【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】

【識別番号】 100118773

【弁理士】

【氏名又は名称】 藤田 節

【選任した代理人】

【識別番号】 100101904

【弁理士】

【氏名又は名称】 島村 直己

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015244

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 抗鶏コクシジウム症組成物

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 鶏コクシジウム症に関与する *Eimeria acervulina*、*Eimeria tenella* 及び *Eimeria maxima* のスポロゾイト及びメロゾイトに共通の免疫原性を有する外膜蛋白質抗原又はその免疫原性断片で免疫された鶏の卵より得られた抗体を含有する経口用抗鶏コクシジウム症組成物。

【請求項 2】 更に、乳酸菌を含有する請求項 1 記載の組成物。

【請求項 3】 更に、クロストリジウム・パーフリンジェンスで免疫された鶏の卵より得た抗体を含有する請求項 1 又は 2 記載の組成物。

【請求項 4】 鶏コクシジウム症の予防又は治療に用いられる請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 5】 請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の組成物を含有する鳥類用飼料。

【請求項 6】 請求項 1 に記載の抗体、又は該抗体と、乳酸菌及び／又はクロストリジウム・パーフリンジェンスで免疫された鶏の卵より得た抗体とを鳥類に経口投与することを特徴とする鶏コクシジウム症の予防又は治療方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、鶏コクシジウム症の予防及び治療に有効な組成物に関する。更に詳しくは、鶏などの鳥類の鶏コクシジウム症に対して優れた予防効果及び治療効果を有し、鶏コクシジウム症からの感染防御や鶏コクシジウム症に伴う体重減少といった臨床症状の改善、又は鶏コクシジウム症の治療に極めて有効な組成物に関する。

【0002】

【従来の技術】

鶏コクシジウム症 (coccidiosis in chickens) はアイメリア (*Eimeria*) 属の原虫の感染によって起こる。鶏では寄生のアイメリア属は種によって症状、寄生部位

、病変が異なる。特に病原体として重視されているものは、*Eimeria tenella*、*E. necatrix*、*E. maxima*、*E. brunetti*、*E. acervulina*の5種類で、他に*E. mitis*、*E. praecox*、*E. hagani*、*E. mivati*などが知られている。鶉では*E. uzura*、*E. tsunodai*など、七面鳥では*E. meleagrimitis*、*E. adenoides*、*E. gallopovonis*など、ほろほろ鳥では*E. grenieri*、*E. numidae*などの感染により起こることが知られている。鶏の疾病のなかで最も被害が大きいものの一つである。オーシストの経口的摂取によって感染が成立する。種々の下痢、食欲不振、廃絶、体重減少などの症状を呈し、死亡も認められる。鶏の日齢、性別、品種に関係なく発生する。平飼いの鶏舎で発生しやすいが、近年多段式ゲージの採卵鶏でも発生が報告されている。また、クロストリジウム・パーフリンジェンス(*Clostridium perfringens*)との混合感染により症状は重篤化する。オーシストによる鶏舎の汚染防止やコクシジウム予防剤の使用で対応する。予防には、各種合成抗鶏コクシジウム剤及びイオノフォラス抗生物質がコクシジウム予防剤として使用できる。治療には、サルファ剤又はサルファ剤とピリミジン系薬剤との合剤が用いられる。ワクチンも実用化されている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

鶏は孵化後10週間以内しかコクシジウム予防剤を使用できず、またブロイラーでは出荷前7日間の休薬期間が義務づけられている。これは、投薬した場合、一定期間は卵、肉の出荷が禁止されているためである。このコクシジウム予防剤の使用できない期間に鶏コクシジウム症が発生しやすい。更に、薬剤耐性鶏コクシジウムが増加しているため各農場に有効な予防剤を選択する必要がある。鶏コクシジウム症のコクシジウム予防剤は一時期極めて多くのものが開発されたが、その後、残留、人間を含む他の生物への悪影響、薬剤耐性鶏コクシジウムの出現などにより、使用できなくなっている。欧州では2007年以降コクシジウム予防剤の使用が禁止になる。わが国でも飼料添加物に対する規制法が実施されてから、その使用は著しく制限されるようになった。

【0004】

生ワクチンは、経口投与するもので、病原性の弱い種類で計画免疫し、強毒種

の感染を防止しようとする試みがなされている。また、数種類のオーシストの混合したものを雛に与えて、死亡しない程度に感染させ免疫を得させようとする鶏コクシジウム生ワクチンは、実際的には養鶏場が汚染されるので、むしろマイナスの点が多い。不活化ワクチンでは感染阻止抗体の産生が低く、また効果も低い。また、ワクチンを雛に免疫しても感染防御抗体が産生されるまでに数週間かかるため、プロイラーにおける利用価値は低い。

【0005】

一方、鶏コクシジウム症になると腸内の菌叢が崩れ、下痢などの症状を引き起こし、特に下痢は長期に亘る。また、これにより体力が消耗し、免疫力が低下することにより壊死性腸炎にかかりやすくなる。

【0006】

特許第2548115号、特許第2698778号、特許第2698779号のトリ抗体を用いた哺乳動物の受動免疫化は、受動免疫のための異種抗体（鶏卵由来）を投与（特に、注射などの非経口投与）する際に、アナフィラキシーショックや血清病などが起こるのを防止するため、予防、治療のための抗体投与の前に予め、抗体を含有する食物を哺乳動物に与えておき経口免疫耐性（免疫寛容）の状態にしておくものであり、本発明の経口受動免疫防御効果とは全く着想は異なる。また、本発明者らは、ブタの大腸菌症の原因となる腸管毒素原性大腸菌の987P、K88及びK99抗原、及びウシの大腸菌症の原因となる腸管毒素原性大腸菌のK99抗原のいずれか1種以上の抗原で鶏を免疫し、この免疫鶏が産生した卵の少なくとも卵黄を含む部分から抗体を回収することにより得られる、前記抗原に特異的なポリクローナル抗体を含有する、ブタ又はウシの哺乳期における大腸菌症の経口予防剤及び治療剤（特許第2034005号）や、予め食中毒菌を接種した鶏が免疫獲得後に産生した卵の全卵、卵黄もしくは抗体含有画分からなり、該食中毒菌に特異的な抗体を含有する、食鳥の食中毒菌抑制材料（特許第2615673号）について出願している。これらは、鶏卵抗体の有用性を示しているが、細菌に対する鶏卵抗体の経口受動免疫防御効果を示したもので、原虫に対する防御効果は提示していない。現在でも、細菌又はウイルスなどに対する経口受動免疫能の考え方はあるが、原虫に対する経口受動免疫能の考え方は示されていない。

【0007】

一方、鶏コクシジウム症の各種抗原を用いたワクチンに対する報告は多数あるが、受動免疫を用いた報告は少ない。鶏コクシジウムの *Eimeria maxima* の gametocytes に対するマウスモノクローナル抗体を作製し、鶏コクシジウム症における受動免疫を確認した論文 (Infection and Immunity, 56: 972-976, 1988, Infection and Immunity, 58: 557-562, 1990) があるが、マウスモノクローナル抗体を経口でなく静脈内注射する投与方法で試験を行っており、全く実用的でない。

【0008】

本発明者らは前記の問題点を解決すべく鋭意検討した結果、鶏コクシジウム症に関与する *Eimeria acervulina*、*Eimeria tenella* 及び *Eimeria maxima* のスポロゾイト及びメロゾイトに共通の免疫原性を有する外膜蛋白質抗原又はその免疫原性断片を抗原として鶏、鶉又は他の鳥類を免疫して得られた卵に含まれる抗鶏コクシジウム症抗体を鶏などの鳥類に投与することにより、アイメリア属のスポロゾイト又はメロゾイトに抗体が付着し、スポロゾイト又はメロゾイトが上皮細胞に付着及び侵入するのを阻止することにより、その病原性を消失せしめることを見出した。更に、本抗鶏コクシジウム症抗体を投与するに際して乳酸菌を併せて給与することによって、腸内菌叢の改善や免疫増強と同時に本抗体がより有効に作用し、鶏コクシジウム症の予防及び治療に優れた効果を発揮することを見出した。また、本抗鶏コクシジウム症抗体を投与するに際してクロストリジウム・パーフリンジェンスで免疫された鶏の卵より得た抗体を併せて給与することによって、クロストリジウム・パーフリンジェンスとの混合感染による症状の重篤化を抑えることにより本抗体がより有効に作用し、鶏コクシジウム症の予防及び治療に優れた効果を発揮することを見出し、発明を完成するに至った。

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明は、以下の発明を包含する。

(1) 鶏コクシジウム症に関与する *Eimeria acervulina*、*Eimeria tenella* 及び *Eimeria maxima* のスポロゾイト及びメロゾイトに共通の免疫原性を有する外膜蛋白質抗原又はその免疫原性断片で免疫された鶏の卵より得られた抗体を含有する

経口用抗鶏コクシジウム症組成物。

(2) 更に、乳酸菌を含有する前記(1)に記載の組成物。

(3) 更に、クロストリジウム・パーフリンジェンスで免疫された鶏の卵より得た抗体を含有する前記(1)又は(2)に記載の組成物。

(4) 鶏コクシジウム症の予防又は治療に用いられる前記(1)～(3)のいずれかに記載の組成物。

(5) 前記(1)～(4)のいずれかに記載の組成物を含有する鳥類用飼料。

(6) 前記(1)に記載の抗体、又は該抗体と、乳酸菌及び／又はクロストリジウム・パーフリンジェンスで免疫された鶏の卵より得た抗体とを鳥類に経口投与することを特徴とする鶏コクシジウム症の予防又は治療方法。

【0010】

【発明の実施の形態】

以下、本発明について詳細に説明する。

【0011】

本発明は、抗原として、鶏コクシジウム症に関与する*Eimeria acervulina*、*Eimeria tenella*及び*Eimeria maxima*のスποロゾイト及びメロゾイトに共通の免疫原性を有する外膜蛋白質抗原又はその免疫原性断片を用いる。

【0012】

前記抗原は、*Eimeria acervulina*、*Eimeria tenella*及び*Eimeria maxima*のスποロゾイト及びメロゾイトに共通の抗原であるため、病原体が*Eimeria acervulina*、*Eimeria tenella*及び*Eimeria maxima*のいずれの場合にも有効に作用する。

【0013】

前記抗原としては、例えば、*Avian Diseases*, 44: 379-389, 2000に記載の18～27キロダルトンの可溶性蛋白(F3)又は3-1E蛋白、*J. Parasitol.*, 84: 654-656, 1998に記載の21キロダルトンのメロゾイト蛋白、*Infection and Immunity*, 59: 1271-1277, 1991に記載の防御フラクシオン蛋白(FV)を用いることができる。

【0014】

「免疫原性断片」としては、1つ又はそれ以上のエピトープを含有し、免疫原

として使用し得るものであれば、特に制限はない。

【0015】

抗体は、3個のアミノ酸からなるアミノ酸配列を認識できるとの報告(F. Hudecz et al., J. Immunol. Methods, 147: 201-210 (1992))があることから、前記免疫原性断片の最小単位としては、アミノ酸残基数3以上のペプチドが考えられ、好ましくはアミノ酸残基数5以上、更に好ましくはアミノ酸残基数10以上のペプチド又はポリペプチドが挙げられる。

【0016】

また、前記の外膜蛋白質抗原又はその免疫原性断片は、液相法及び固相等のペプチド合成の方法により合成することもでき、更にペプチド自動合成装置を用いてもよく、日本生化学会編「生化学実験講座1 タンパク質の化学IV」, 東京化学同人, 1975年、泉屋ら「ペプチド合成の基礎と実験」, 丸善, 1985年、日本生化学会編「続生化学実験講座2 タンパク質の化学 下」, 東京化学同人, 1987年等に記載された方法に従い合成することができる。

【0017】

更に、前記の外膜蛋白質抗原又はその免疫原性断片は、対応する塩基配列を有するDNA又はRNAより遺伝子工学技術（例えば、日本生化学会編「続生化学実験講座1 遺伝子研究法I」, 東京化学同人, 1986年、日本生化学会編「続生化学講座1 遺伝子研究法II」, 東京化学同人, 1986年、日本生化学会編「続生化学実験講座1 遺伝子研究法III」, 東京化学同人, 1987年参照）を用いて調製してもよい。

【0018】

前記免疫原性断片が低分子物質の場合には、通常、該断片に担体を結合させたものを用いる。前記担体としては、スカシガイのヘモシアニン (KLH)、ウシ血清アルブミン (BSA)、ヒト血清アルブミン (HSA)、ニワトリ血清アルブミン、ポリ-L-リシン、ポリアラニルリシン、ジパルミチルリシン、破傷風トキソイド又は多糖類等を用いることができる。前記免疫原性断片と担体の結合には、グルタルアルデヒド法、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド法、マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシサクシニミドエス

テル法、ビスジアゾ化ペンジジン法、N-サクシミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン酸法等の公知の方法を用いることができる。また、ニトロセルロース粒子、ポリビニルピロリドン、リポソーム等の担体に前記免疫原性断片を吸着させたものを免疫原とすることもできる。

【0019】

免疫方法は、免疫原（前記外膜蛋白質抗原又はその免疫原性断片）の皮下注射や筋肉内注射、経口投与などが用いられる。接種免疫原量は蛋白質又はペプチドとして0.01～10mgが好適である。初回免疫から2～10週後に追加免疫を行うことにより、より高い抗体価が得られる。追加免疫から2週間目以降には鶏コクシジウム抗原に特異的に反応する抗体が、鶏の血清中のみならず卵にも生成される。こうして免疫された抗体は、通常4ヶ月にわたって高い抗体価が維持される。たとえ、抗体価が低下してきた場合でも、同様の手技で追加免疫を行えば高い抗体価が持続できる。この卵の抗体活性は、蛍光抗体法又は酵素抗体法によって測定できる。

【0020】

前記免疫原は、アジュバントと混合して免疫注射することが好ましい。アジュバントとしては、フロイント完全アジュバント、フロイント不完全アジュバント、水酸化アルミニウムアジュバント、百日咳菌アジュバント等の公知のものを用いることができる。

【0021】

前記のようにして得られた卵の抗体は全卵又は卵黄として溶液にして、又は噴霧乾燥機等により乾燥し粉にして使用することができ、また全卵又は卵黄より脱脂して卵水溶性蛋白質を使用することもでき、更に抗体を精製又は粗精製して用いてもよい。

【0022】

本発明の組成物は、鳥類、特に鶏に適用される。前記抗体の投与量は、一般には、1日当り1羽に対し抗体価で1～10⁶倍であるが、鳥類の週齢、性別、品種等により適宜増減することが好ましい。

【0023】

また、前記抗体を投与するに際して、乳酸菌を併用すると、鶏コクシジウム症に伴う体重減少等の症状がより改善される。乳酸菌は、通常、前記抗体1gに対して乳酸菌 $10 \sim 10^9$ 個の割合で用いられる。乳酸菌は、前記抗体と同時に投与してもよいし、間隔をおいて投与してもよい。

【0024】

ここで使用される乳酸菌としては、ラクトバチルス、ビフィドバクテリウム、ストレプトコッカス、エンテロコッカス、ラクトコッカスなどの属に属する乳酸菌で種は問わず、単独又は複数株を混合してもよい。ラクトバチルス属に属する乳酸菌としては、例えば*Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. lactis*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. salivarius*、ビフィドバクテリウム属に属する乳酸菌としては、例えば*Bifidobacterium adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. pseudolongum*, *B. thermophilum*、ストレプトコッカス属に属する乳酸菌としては、例えば*Streptococcus agalactiae*, *S. salivarius*, *S. thermophilus*、エンテロコッカス属に属する乳酸菌としては、例えば*Enterococcus faecalis*, *E. faecium*、ラクトコッカス属に属する乳酸菌としては、例えば*Lactococcus lactis*が挙げられる。

【0025】

また、前記抗体を投与するに際して、クロストリジウム・パーフリンジェンスで免疫された鶏の卵より得た抗体（以下「抗クロストリジウム・パーフリンジェンス抗体」という。）を併用すると、鶏コクシジウム症に伴う体重減少等の症状がより改善される。抗クロストリジウム・パーフリンジェンス抗体は、通常、抗鶏コクシジウム症抗体1gに対して0.01～100gの割合で用いられる。抗クロストリジウム・パーフリンジェンス抗体は、前記抗鶏コクシジウム症抗体と同時に投与してもよいし、間隔をおいて投与してもよい。

【0026】

抗クロストリジウム・パーフリンジェンス抗体は、免疫原としてクロストリジウム・パーフリンジェンスを用いる以外は、前記の抗鶏コクシジウム症抗体と同様の方法により調製することができる。また、免疫原としてクロストリジウム・

パーフリンジェンスと、前記外膜蛋白質抗原又はその免疫原性断片とを同時に使用することにより、抗クロストリジウム・パーフリンジェンス抗体及び抗鶏コクシジウム症抗体を同時に調製することもできる。

【0027】

クロストリジウム・パーフリンジェンスとしては、例えば、J. Anim. Sci., 75: 19-25, 1997に記載の蛋白、Avian Diseases, 21: 241-255, 1977に記載のトキシシン、Vet. Rec., 120: 435-439, 1987に記載の蛋白、Vaccine, 11: 1253-1258, 1993に記載の蛋白、FEMS Immunol. Med. Microbiol., 7: 321-336, 1993に記載の蛋白を抗原として用いることができる。

【0028】

本発明の抗鶏コクシジウム症組成物は、各有効成分の濃度が0.001%~10%の溶液として、更に粉末、顆粒、錠剤又はペースト状で飼料に対して各有効成分の濃度が0.001%~10%の範囲で給与される。また、抗鶏コクシジウム症抗体の給与に際しては、胃での消化分解を防ぐために、腸溶性の剤形にしてもよい。

【0029】

【実施例】

【実施例1】

鶏コクシジウムのEimeria acervulina NA株 (PE0101)、Eimeria tenella NM株 (PE0102)、Eimeria maxima NT株 (PE0103) のオーシストを4週齢の鶏に各々 2×10^6 個経口感染させ、感染後4日目に剖検し、腸管及び腸管内容物を得た。各スポロゾイト及びメロゾイトの精製は、Avian Diseases, 39: 538-547, 1995にしたがって行った。Eimeria acervulina NA株のメロゾイトの可溶性外膜蛋白質をSDS-PAGEで泳動することにより18~27kDの外膜蛋白質を得た(Avian Diseases, 44: 379-389, 2000)。この外膜蛋白質0.5mg/mlを含有する溶液とフロイント不完全アジュバントとを乳化し、12週齢の雌鶏に、左右の胸筋に1mlずつ注射し1回目の免疫を行った。同様にして、6週間後に2回目の免疫を同様に行った。2回目の免疫から2週間後、この鶏の血液中の抗鶏コクシジウム症抗体の酵素抗体測定法(ELISA)(Avian Diseases, 44: 3

79-389, 2000)による抗体価は、30,000～120,000倍であった。この鶏が産んだ卵の抗体価は30,000～120,000倍であった。この抗体価は4ヶ月間持続した。この卵を集め、噴霧乾燥により全卵粉末の鶏卵抗体を作成した。この粉末の抗体価は60,000倍であった。また、本抗体のスποロゾイト及びメロゾイトに対する交差性を間接免疫蛍光染色(Avian Diseases, 44: 379-389, 2000)で検討した結果、本抗体はアイメリア属の*Eimeria acervulina*、*Eimeria tenella*、*Eimeria maxima*のスποロゾイト及びメロゾイトの表面を特異的に蛍光染色し、共通の抗体であることが確認できた。

【0030】

[実施例2]

実施例1で得た抗鶏コクシジウム症抗体をブロイラーの飼料に添加して鶏コクシジウム症実験感染鶏(*Eimeria tenella*) (Avian Disease, 31: 112-119, 1987)に対する効果を検討した。供試動物はブロイラー専用種チャンキーとし、抗体はブロイラー肥育前期用標準飼料(SDB No.1: 財団法人畜産生物安全研究所)に0.1%、1%及び10%となるように添加して投与した。*Eimeria tenella* ET株のオーシスト感染は1000個/羽(J. Protozool, 9: 154-161, 1962)とし、各群10羽ずつ割付け設定した。また感染後の観察期間は、2週間とした。検査項目は、増体量及び飼料要求率を主な検査項目とし、その他にO.P.G. (Oocysts Per Gram of faeces) 及び盲腸病変観察を実施した(角田清監修「鶏コクシジウム症」、チクサン出版社、1983年)。その結果、増体量で0.1%投与群でも効果が確認され、飼料要求率では1.0%投与で効果が確認された。

【0031】

以上のことから、鶏コクシジウム症の攻撃に対して抗鶏コクシジウム症抗体を飼料に0.1%以上投与することにより増体量及び飼料要求率を含めた改善が認められた。総合判定は、得られた各観察項目の数値を元に被験物質の効果を判定し、極めて有効な効果が得られた。

【0032】

【表 1】

	非感染群	<i>E. tenella</i> 感染群			
	非添加群	飼料に添加した抗体の割合			
	0%	0%	0.1%	1%	10%
平均増体量 (g)	731	578	622	620	666
相対増体率 (%) ^{a)}	100	79	85	85	91
平均飼料摂取量 (g)	879	885	910	862	915
飼料要求率 ^{b)}	1.20	1.53	1.46	1.39	1.37
生存率 (%)	100	100	100	100	100
OPG (x10 ⁴) 7 日目	0.0	9.7	5.1	4.2	0.4
オーシスト値 ^{c)}	0	40	20	10	5
盲腸病変値 ^{d)}	0	20	10	5	5
ACI 値 ^{e)}	200	119	155	170	181
			少し有効	中程度有効	極めて有効

【0033】

a): 相対増体率 (%) = 感染群の増体率 ÷ 非感染群の増体率 × 100

b): 飼料要求率 = 平均飼料摂取量 ÷ 平均増体量

c): 対照群に対する O.P.G. の割合 = 投薬群の O.P.G. ÷ 感染無投薬対照群の O.P.G. × 100 より、基準を元に各試験群のオーシスト値を求めた。0: 0~1%、+5: 1.1~25%、+10: 26~50%、+20: 51~75%、+40: 76~100%。

d): 盲腸病変値は、0: 病変認められず; +1: 盲腸壁に極めて少数の点状出血斑が散在しているが、内容物は正常である; +2: 内容物にわずかな血液を混じり、多数の出血病巣が見られる; +3: 多量の血液、あるいは盲腸コア（凝血または灰白色チーズ状、バナナ型の塊）を盲腸内に含み、盲腸壁の肥厚、および盲腸の変形、萎縮が明瞭である; +4: 盲腸は著しく萎縮し、病変は直腸部まで達する。壁は極度に肥厚し、盲腸内には凝血あるいは盲腸コアを含んでいる; の判定基準にしたがって 1 羽平均値を求め、10 羽に換算した値を表 1 に示した。

e): ACI 値 (Anticoccidial Index: 抗鶏コクシジウム指数) =

(相対増体率 + 生存率) - (オーシスト値 + 病変値)

ACI 値: 180 以上…極めて有効、160~179…中程度有効、

120～161…少し有効、120未満…効力なし

【0034】

[実施例3]

実施例1で得た抗鶏コクシジウム症抗体と乳酸菌のラクトバチルス・アシドフィルスを混合した飼料を用いて鶏コクシジウム症実験感染鶏 (*Eimeria tenella*) に対する効果を検討した。乳酸菌のラクトバチルス・アシドフィルス ATCC4356 株は MRS 培地で培養後、凍結乾燥により 1×10^{11} 個/g の粉末を作製した。供試動物はブロイラー専用種チャンキーとし、ブロイラー肥育前期用標準飼料 (SDB No.1) に前記抗体 0.1% と乳酸菌 10^6 個/g を添加して投与した。*Eimeria tenella* ET 株のオーシスト感染は 1000 個/羽とし、各群 10 羽ずつ割付け設定した。また感染後の観察期間は、2 週間とした。検査項目は、増体量及び飼料要求率を主な検査項目とし、その他に O. P. G. 及び盲腸病変観察を実施した。その結果、増体量で抗体と乳酸菌の投与群で効果が確認され、飼料要求率でも効果が確認された。

【0035】

以上のことから、鶏コクシジウム症の攻撃に対して抗鶏コクシジウム症抗体と乳酸菌のラクトバチルス・アシドフィルスを飼料に投与することにより増体量及び飼料要求率を含めた改善が認められた。総合判定は、得られた各観察項目の数値を元に被験物質の効果を判定したところ、極めて有効な効果が認められた。

【0036】

【表 2】

	非感染群	<i>E. tenella</i> 感染群		
	非添加群	飼料に添加		
	対照群	対照群	抗体 0.1%	抗体+乳酸菌
平均増体量 (g)	731	578	622	666
相対増体率 (%)	100	79	85	91
平均飼料摂取量 (g)	879	885	910	845
飼料要求率	1.20	1.53	1.46	1.27
生存率 (%)	100	100	100	100
OPG (x10 ⁴) 7 日目	0.0	9.7	5.1	2.2
オーシスト値	0	40	20	5
盲腸病変値	0	20	10	5
ACI 値	200	119	155	181
			少し有効	極めて有効

【0037】

【実施例 4】

実施例 1 で得た抗鶏コクシジウム症抗体とクロストリジウム・パーフリンジェンスで免疫された鶏の卵より得た抗クロストリジウム・パーフリンジェンス抗体を混合した飼料を用いて鶏コクシジウム症 (*Eimeria tenella*) とクロストリジウム・パーフリンジェンスの混合感染実験鶏 (Avian Disease, 24: 324-333, 1980) に対する効果を検討した。

【0038】

抗クロストリジウム・パーフリンジェンス抗体は、クロストリジウム・パーフリンジェンス ATCC3624 株をチオグリコレート培地で培養し、この 1×10^{10} 個/ml を含有する菌液とフロイント不完全アジュバントとを乳化し、12 週齢の雌鶏に、左右の胸筋に 1 ml ずつ注射し 1 回目の免疫を行った。同様に、6 週間後に 2 回目の免疫を同様に行った。2 回目の免疫から 2 週間後、この鶏の血液中の抗クロストリジウム・パーフリンジェンス抗体の菌体凝集反応法による抗体価は、300～1200 倍であった。この鶏が産んだ卵の抗体価は 300～1200 倍であった。この抗体価は 4 ヶ月間持続した。この卵を集め、噴霧乾燥により全卵粉末の鶏卵抗体を作成した。この粉末の抗体価は 600 倍であった。

【0039】

供試動物はブロイラー専用種チャンキーとし、ブロイラー肥育前期用標準飼料 (SDB No.1) に抗鶏コクシジウム症抗体 0.1% と抗クロストリジウム・パーフリンジェンス抗体 0.1% を添加して投与した。Eimeria tenella ET株のオーシスト感染は 1000 個/羽とし、クロストリジウム・パーフリンジェンス ATCC3624株の感染は 10^7 個/羽とし、各群 10 羽ずつ割付け設定した。また感染後の観察期間は、2 週間とした。検査項目は、増体量及び飼料要求率を主な検査項目とし、その他に O. P. G. 及び盲腸病変観察を実施した。その結果、増体量で抗鶏コクシジウム症抗体と抗クロストリジウム・パーフリンジェンス抗体の混合投与群で効果が確認され、飼料要求率でも効果が確認された。

【0040】

以上のことから、鶏コクシジウム症とクロストリジウム・パーフリンジェンスの混合攻撃に対して抗鶏コクシジウム症抗体 0.1% と抗クロストリジウム・パーフリンジェンス抗体 0.1% を飼料に併用して投与することにより増体量及び飼料要求率を含めた改善が認められた。総合判定は、得られた各観察項目の数値を元に被験物質の効果を判定したところ、極めて有効な効果が認められた。

【0041】

【表 3】

	非感染群	<i>E. tenella</i> + クロストリジウム混合感染群		
	非添加群	飼料に添加		
	対照群	対照群	鶏コクシウム症抗体 0.1%	鶏コクシウム症抗体 0.1% + クロストリジウム抗体 0.1%
平均増体量 (g)	731	563	620	629
相対増体率 (%)	100	77	85	86
平均飼料摂取量 (g)	879	880	905	865
飼料要求率	1.20	1.56	1.46	1.38
生存率 (%)	100	100	100	100
OPG ($\times 10^4$) 7 日目	0.0	12.0	6.3	0.1
オーシスト値	0	40	20	0
盲腸病変値	0	24	12	3
ACI 値	200	113	153	183
			少し有効	極めて有効

【0042】

【実施例 5】

実施例 1 で得た抗鶏コクシジウム症抗体を飼料に添加して鶏コクシジウム実験感染鶏 (*Eimeria acervulina*) (Avian Disease, 31: 112-119, 1987) に対する効果を検討した。供試動物はブロイラー専用種チャンキーとし、抗体はブロイラー肥育前期用標準飼料 (SDB No.1) に 0.1%、1% 及び 10% となるように添加して投与した。*Eimeria acervulina* EA 株のオーシスト感染は 1000 個/羽とし、各群 10 羽ずつ割付けた。また感染後の観察期間は、2 週間とした。検査項目は、増体量及び飼料要求率を主な検査項目とし、その他に O.P.G. 及び小腸病変観察を実施した。その結果、増体量で 0.1% 投与群でも効果が確認された。

【0043】

以上のことから、鶏コクシジウム症の攻撃に対して抗鶏コクシジウム症抗体を飼料に 0.1% 以上投与することにより増体量の改善が認められた。

【0044】

【表 4】

	非感染群	<i>E. acervulina</i> 感染群			
	非添加群	飼料に添加した抗体の割合			
	0%	0%	0.1%	1%	10%
平均増体量 (g)	731	580	630	650	680
相対増体率 (%)	100	79	86	89	93
平均飼料摂取量 (g)	879	826	869	845	820
飼料要求率	1.20	1.4	1.38	1.30	1.22
生存率 (%)	100	100	100	100	100
OPG (x10 ⁴) 7 日目	0.0	5.0	4.5	4.0	0.3
オーシスト値	0	40	40	40	5
小腸病変値 ^{a)}	0	20	5	5	0
ACI 値	200	119	141	144	188
			少し有効	少し有効	極めて有効

【0045】

a) : 小腸病変値は、0 : 病変認められず ; +1 : 十二指腸にオーシストを含んだ白色壊死病巣が散在してみられる ; +2 : 白色壊死病巣の数が増加し、かつ小腸上部にまで病巣が延長する ; +3 : 病巣は増加し融合する。小腸壁は肥厚し、内容物は

水様である；+4：お互いに融合した多数の病巣により、十二指腸ならびに小腸上部は灰色を呈する。壁は強度に肥厚し、クリーム状の粘液を内部に含む；の判定基準にしたがって1羽平均値を求め、10羽に換算した値を表4に示した。

【0046】

実施例2、3及び5において、抗鶏コクシジウム症抗体、又は該抗体と乳酸菌を鶏に対して飼料に混ぜて連続して給与したとき、鶏コクシジウム症実験感染させたところ発症が軽減され、増体効果が見られた。また、鶏コクシジウム症に感染した鶏に抗鶏コクシジウム症抗体と乳酸菌を飼料に混合して給与したとき、その症状は著しく改善され、増体量及び飼料要求率を含めた改善が認められた。また、抗クロストリジウム・パーフリンジェンス抗体を併用すると鶏コクシジウム症の発症を予防し、増体量及び飼料要求率を含めた改善が認められた。

【0047】

【発明の効果】

本発明における抗鶏コクシジウム症抗体と乳酸菌又は抗クロストリジウム・パーフリンジェンス抗体から成る抗鶏コクシジウム症組成物は、鶏コクシジウムに対して特異的に作用するので、抗鶏コクシジウム剤又はワクチンの代わりに鶏コクシジウム症に対して極めて有効な予防効果を発揮するとともに、鶏コクシジウム症の症状軽減及び体重増加に極めて有効に働く。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 鶏コクシジウム症を予防又は治療することを目的とする。

【解決手段】 鶏コクシジウム症に関与する *Eimeria acervulina*、*Eimeria tenella* 及び *Eimeria maxima* のスポロゾイト及びメロゾイトに共通の免疫原性を有する外膜蛋白質抗原又はその免疫原性断片で免疫された鶏の卵より得られた抗体、又は該抗体と、乳酸菌及び／又はクロストリジウム・パーフリンジェンスで免疫された鶏の卵より得た抗体とを鳥類に経口投与することにより鶏コクシジウム症を予防又は治療する。

【選択図】 なし

特願 2002-189137

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000129976]

1. 変更年月日
[変更理由]

1990年 8月 6日

新規登録

住 所
氏 名

岐阜県岐阜市折立296番地1

株式会社ゲン・コーポレーション